




PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 INTERNATIONALES ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: <p style="text-align: center; font-weight: bold;">C12Q 1/68</p>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/23250 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)									
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06961 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98) (30) Prioritätsdaten: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">197 48 690.8</td> <td style="width: 30%;">4. November 1997 (04.11.97)</td> <td style="width: 40%;">DE</td> </tr> <tr> <td>198 14 001.0</td> <td>28. März 1998 (28.03.98)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>198 14 828.3</td> <td>2. April 1998 (02.04.98)</td> <td>DE</td> </tr> </table> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schloßbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Vaerlose (DK). (74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).		197 48 690.8	4. November 1997 (04.11.97)	DE	198 14 001.0	28. März 1998 (28.03.98)	DE	198 14 828.3	2. April 1998 (02.04.98)	DE	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
197 48 690.8	4. November 1997 (04.11.97)	DE									
198 14 001.0	28. März 1998 (28.03.98)	DE									
198 14 828.3	2. April 1998 (02.04.98)	DE									
(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS (54) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND SENSITIVES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid, comprising the following steps: the production of a number of enhancers of a fragment of said nucleic acid with a length of less than 100 nucleotides using two primers, one of said primers being able to bind to a first binding sequence (A) of a strand of the nucleic acid and the other primer being able to bind to a second binding sequence (C') which is essentially complementary to a sequence (C), said sequence (C) not overlapping with (A) and being positioned in the direction 3' from A, in the presence of a probe with a binding sequence (D) which is able to bind to the third sequence (B) positioned between the sequences (A) and (C) or the complement (B') thereof, said probe containing a reporter group and a quencher group, using a polymerase with 5' nuclease activity; and detection of the nucleic acid through the measurement of a signal which is determined by the release of the reporter group.</p>											
(57) Zusammenfassung <p>Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure enthaltend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit einer Länge von weniger als 100 Nukleotiden mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit (A) nicht überlappenden, in 3'-Richtung von (A) gelegenen Sequenz (C) im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz (D), welche an die zwischen den Sequenzen (A) und (C) gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist.</p>											

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

7/8AET

09/530747
422 Rec'd PCT/PTO 04 MAY 2000**Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren**

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem eine Amplifikation eines Teilstückes dieser Nukleinsäuren vorgenommen wird und wobei dieses Teilstück im Hinblick auf seine Basensequenz bestimmte Bedingungen erfüllen muß, sowie ein Reagenzkit enthaltend zwei Primer und eine Sonde, die dieses Teilstück definieren.
- 10 Eine der meist angewandten molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Nukleinsäuren ist Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen ist von Bedeutung im Grundlagenbereich, jedoch von besonderer Bedeutung in verschiedenen Anwendungsfeldern, z. B. in den Bereichen medizinische Diagnostik, forensische Diagnostik, Lebensmitteldiagnostik, Umweltdiagnostik, Pflanzenschutz und
- 15 Tiermedizin.

- Als Sonde werden dabei entweder Oligonukleotide (kurze DNA oder RNA) oder Polynukleotide (längere DNA oder RNA) verwendet. Dabei haben die kürzeren Sonden gegenüber den längeren Sonden den Vorteil größerer Sequenzselektivität, wegen des
- 20 kürzeren Hybridisierungsbereichs aber den Nachteil geringerer Sensitivität. Eine verbesserte Sensitivität und Sequenzselektivität wird mit PNA-Sonden (Peptidnukleinsäuren, z. B. WO 92/20702) erreicht, da diese Sonden eine höhere Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren haben (höherer T_m) und durch eine höhere Basendiskriminierung gekennzeichnet sind (ΔT_m). Zusätzlich können Sonden zum
- 25 Nukleinsäure-Nachweis Markierungsgruppen tragen, die entweder zum Fangen und/oder zur Detektion von Hybridkomplexen aus Sonde und nachzuweisender Nukleinsäure geeignet sind.

Zum Nukleinsäure-Nachweis durch Hybridisierung werden eine oder mehrere Sonden entweder zur Hybridisierung in Lösung oder auf festen Trägern verwendet. Bei Nukleinsäure-Nachweisen in Lösung spricht man von homogenen Nachweisformaten, bei Nachweis auf festen Trägern und/oder vermittelt durch feste Träger von heterogenen Nachweisformaten. Bei den heterogenen Nachweisverfahren kann die nachzuweisende Nukleinsäure auf dem festen Träger vorgebunden sein (z. B. dot blot). Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen mit einer Lösung, die die Sonde enthält. Umgekehrt kann die Sonde auf dem festen Träger vorgebunden sein (z. B. reverse dot blot). Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen der gebundenen Sonde mit einer Lösung, welche die nachzuweisende Nukleinsäure enthält. Alternativ dazu kann der Komplex aus nachzuweisender Nukleinsäure und Sonde erst in Lösung gebildet werden und die Bindung an den festen Träger erst anschließend erfolgen. Bei homogenen Testformaten werden z. B. Sondenpaare verwendet, die endständig energieübertragende Gruppen tragen und die über Co-Hybridisierung an die nachzuweisende Nukleinsäure in unmittelbaren Kontakt gebracht werden und dadurch ein Signal erzeugen. Alternativ dazu können auch Sonden verwendet werden, die nach Bindung an die nachzuweisende Nukleinsäure durch enzymatische 5'-Nukleaseaktivität in Lösung von einem gequenchten in einen ungequenchten Zustand überführt werden.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch alleinige Sonden-Hybridisierung hat nur begrenzte Sensitivität. So ist selbst mit empfindlichen Detektions-Markierungsgruppen wie ^{32}P , Digoxigenin, Biotin, Fluorescein, Ruthenium-Chelate, Fluorescein, Rhodamin oder AMCA allein nur eine Sensitivität in pg- bis fg-Bereich möglich. Zum empfindlichen Nukleinsäure-Nachweis gerade im medizinisch-diagnostischen Bereich sind jedoch Sensitivitäten im ag-Bereich und eine hohe Nachweisspezifität notwendig. Dies gilt sowohl für den Nachweis von körperfremden Nukleinsäuren z. B. in Form von Infektionserregern, als auch für den Nachweis der An- oder Abwesenheit oder Veränderung körpereigener Nukleinsäuren. Hohe Nachweissensitivität und Nachweisspezifität ist aber auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

- So müssen manche Infektionserreger, wie z. B. HCV, HIV und HBV schon in wenigen Kopien nachgewiesen werden, um rechtzeitig erfolgreiche medizinische Interventionsmaßnahmen, z. B. durch frühzeitige Arzneimittelbehandlung, ansetzen zu können. Für solch frühzeitige Nachweise von Infektionserregern ist der Nachweis von
- 5 Nukleinsäure-Sequenzen der Infektionserreger von Vorteil, da wegen der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Vervielfältigungstechniken (Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren) ein empfindlicher Nachweis schon in einer frühen Infektionsphase (Latenzphase) möglich ist. Die Möglichkeit der gezielten Vermehrung des nachzuweisenden Agens gibt es nur im Fall von Nukleinsäuren, nicht aber im Fall von immunologischen
- 10 Nachweisverfahren. Bei diesen Verfahren ist eine Steigerung der nachzuweisenden Infektionserreger-spezifischen Partikel nur über die humorale Immunantwort über Bildung von entsprechenden Infektionserreger-spezifischen Antikörpern möglich; diese Immunantwort erfolgt jedoch erst nach Ablauf der Latenzzeit und ist eine
- 15 Nukleinsäure-Hybridisierung den Vorteil, daß z. B. der Infektionserreger direkt nach Infektion und sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

- Der Erfolg von medizinischen Interventionsmaßnahmen ist jedoch auch davon abhängig, daß der Infektionserreger nicht nur frühzeitig mit hoher Sensitivität, sondern auch sehr spezifisch nachgewiesen werden kann. Zur gezielten Behandlung ist daher
- 20 eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Infektionserregern, wie z. B. HAV, HBV, HCV, HIV, verschiedene Herpes-Viren, HPV, sowie die Unterscheidung einzelner Subtypen, wie z. B. HIV-1 und HIV-2, von Bedeutung. Dabei ist aber auch entscheidend, daß quantitative Aussagen gemacht werden können und keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse erhalten werden, da solche falschen
- 25 Ergebnisse u.U. gravierende therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies setzt Richtigkeit und hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraus. Daher muß der Nukleinsäure-Nachweis nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr spezifisch und reproduzierbar sein. Der spezifische und sensitive Nukleinsäure-Nachweis muß auch rasch erfolgen, damit eine gezielte Therapie umgehend erfolgen kann.

- Oftmals ist auch von Bedeutung, mehrere Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und HBV nebeneinander nachzuweisen, z. B. im Rahmen von Blutbanken-Screeningtests. Dies erfolgt bei derzeit gängigen Nukleinsäure-Nachweistests durch hintereinandergeschaltete Einzelbestimmungen der nachzuweisenden Infektionserreger.
- 5 Dies hat den Nachteil, daß mehrere Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden müssen, was gerade beim Screening von großen Specimen-Stückzahlen nachteilig ist. Im Rahmen dieser Nukleinsäure-Bestimmungen ist wünschenswert, sensitive und spezifische Testmöglichkeiten verfügbar zu haben, die z. B. eine rasche parallele Bestimmung mehrerer Infektionserreger nebeneinander in einer einzigen Probe
- 10 ermöglichen (Multiplex-Bestimmung).

- Beim Nachweis der An- oder Abwesenheit von körpereigener Nukleinsäure innerhalb bestimmter genomischer Loci und/oder deren Veränderungen, wie z. B. ererbte, spontane oder eine Mischung aus ererbten und spontanen Mutationen, Deletionen, Inversionen, Translokationen, Rearrangements oder Triplet-Expansionsen in Form von
- 15 spezifischen und/oder polymorphen Veränderungen, ist ebenfalls die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren von Vorteil. Die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren ist jedoch nicht nur im medizinischen Sektor sondern auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

- 20 Die bisherigen Testverfahren zum sensitiven und spezifischen Nachweis der An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuren basieren auf der kombinierten Durchführung von Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen (Nukleinsäure-Vermehrung) und Nukleinsäure-Nachweisreaktionen (Detektion).

- Die nachzuweisende Nukleinsäure wird dabei in einer für die Vermehrungsreaktionen
- 25 zugänglichen Form eingesetzt, z. B. in Form von unbehandeltem oder behandeltem Probenmaterial und/oder Probenmaterial-Konzentrierung, z. B. durch Adsorption des unbehandelten oder behandelten Probenmaterials an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen. Durch diese festen Träger erfolgt keine

substantielle Reinigung und/oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer

5 nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugänglichen Form möglich.

Andere Probenvorbereitungs-Verfahren enthalten gezielte Verfahrensschritte zur Nukleinsäure-spezifischen und/oder sequenzspezifischen Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. die Verwendung von festen Trägern mit Nukleinsäure-spezifischen

10 Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden zur selektiven Bindung und Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Nukleinsäure-spezifische Bindung und anschließende Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure. Bei dieser Art von festen Trägern sind Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-

15 Fangsonden an der Oberfläche der festen Träger notwendig. Daher sind zur Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, entweder mehrere feste Träger notwendig, was aufwendiger ist, oder feste Träger mit einer oder mehreren Bindungsgruppen und/oder mit multiplen oder mehreren Fangsonden. Multiple Fangsonden enthalten mehrere Bindungs-

20 sequenzen für mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Diese Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder mehreren und/oder multiplen Fangsonden sind jedoch aufwendiger herzustellen. Ebenfalls sind die Reaktionsbedingungen zur gezielten Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren an Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder Fangsonden schwieriger einzustellen bzw. die Bindung mehrerer

25 nachzuweisender Nukleinsäurearten an eine Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppe oder an eine Fangsonde mit mehreren komplementären Hybridisierungssequenzen schwieriger einzustellen.

Die Vermehrung und der Nachweis der bereitgestellten nachzuweisenden Nukleinsäuren erfolgt in heterogenen oder homogenen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisformaten.

Die Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen und Detektionreaktionen können entweder hintereinander (heterogene Testverfahren) oder gleichzeitig (homogene Testverfahren) erfolgen. Als Vermehrungsreaktionen werden entweder targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, targetabhängige Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen oder Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Die Verwendung von Detektionssystemen zum Nachweis der vermehrten Nukleinsäuren erfolgt entweder über den Einbau von Nukleotiden und/oder die Verwendung von markierten Primern oder markierten Sonden. Die verwendeten Detektionssysteme enthalten entweder direkte oder indirekte Detektionsmarkierungen bzw. gekoppelte sekundäre und tertiäre Nachweiskomponenten. Die Detektion der vermehrten nachzuweisenden Nukleinsäuren kann jedoch auch durch spektroskopische oder physikalische Methoden erfolgen.

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen haben den Nachteil geringer Sensitivität wegen der nicht-exponentiellen Signalvermehrung, erhöhten Störanfälligkeit durch stärkere Tendenz zur Hintergrundsignalbildung durch die Vielzahl der Sondenkomponenten und der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein daran gekoppeltes Detektionssignal targetunabhängig vermehrt wird. Beispiele sind gekoppelte Signalkaskaden (z. B. SELF-Zyklus) oder signalgebende Sonden-Baum- oder -Bürstenstrukturen (z. B. branched DNA).

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten targetabhängigen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen sind wegen der exponentiellen Signalvermehrung zwar sensitiver als die reinen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren, haben aber wiederum den Nachteil der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein davon in einer einleitenden targetabhängigen Primärreaktion abgeleitetes Detektionssignal in Form eines Nukleinsäure-Reportermoleküls Targetsequenzunabhängig enzymatisch vermehrt wird. Beispiele sind die Q β -Replikationsreaktion, bei der ein Q β -Reportermolekül enzymatisch vermehrt wird, oder die Ligase-

Kettenreaktion, bei der Teilstücke der Nukleinsäure-Reportermoleküle sequenzunabhängig enzymatisch verknüpft werden.

Als Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der bisher sensitivsten und spezifischsten exponentiellen targetspezifischen Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. PCR
5 (US-A-4,683,202 bzw EP-B-0 202 362), RT-PCR, SDA, NASBA (EP-A-0 329 822) oder TAM (WO 91/01384), wurden bisher jeweils einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte durch targetsequenzabhängige thermozyklische oder isotherme enzymatische Elongation gegenläufige Primer, die sequenzspezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind und an die Enden der Nukleinsäure-
10 Vermehrungseinheit (Amplikon) der nachzuweisenden Desoxyribo- oder Ribo-Nukleinsäuren oder deren Komplemente binden und somit die Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte begrenzen, erzeugt. Bei diesen Elongationsreaktionen werden alle 4 Basenspezifitäten eingebaut.

Die genannten Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierter
15 targetspezifischer Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion sind wegen Targetsequenz-abhängiger enzymatischer Nukleinsäure-Vermehrungszyklen am spezifischsten. Während lineare targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, wie z. B. die Cycling-Probe-Reaktion, nur zu begrenzter Sensitivität führen, ergeben exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie Elongations-basierte
20 Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR, SDA) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TMA) bisher die sensitivsten und spezifischsten Signale.

Mischformen zwischen targetabhängiger Signal-Nukleinsäure-Vermehrung und
25 targetspezifischer Nukleinsäure-Vermehrung, wie z. B. die Gap-filling Ligase-Kettenreaktion (gap-filling LCR, WO 90/01069), haben zwar gegenüber der nicht-modifizierten LCR einen targetabhängigen Reaktionsschritt, dieser ist aber begrenzt auf limitierte Sequenzabschnitte bestehend aus lediglich 1 oder 2 Basenspezifitäten und damit limitierterer Target-Spezifität.

Für den Nachweis der entstandenen Nukleinsäure stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Der Nachweis der gebildeten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte über Fragment- oder Sequenz-Gelanalyse ist zeitaufwendig und nicht quantitativ. Der Nachweis über trägergebundene Dot-, Slot- oder Reverse-Dot-Blot-Verfahren ist
5 ebenfalls zeitaufwendig und nicht quantitativ.

Quantitative sensitive und spezifische Bestimmungen der nachzuweisenden Nukleinsäuren wurden bisher im Rahmen von heterogenen oder homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten möglich, bei denen das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt entweder durch eingebaute
10 Label oder durch Hybridisierung während oder nach Amplifikation mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement spezifischen Sonde in einem Teil des durch Elongation entstandenen Sequenzabschnitts abgefangen wird. Exponentielle Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformate, bei denen eine Interkalation von Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen erfolgt, sind zwar auch sensitiv, aber nicht
15 sequenzspezifisch.

Bei den heterogenen Reaktionsformaten wird das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt z. B. entweder über eine Primer-Fangmodifikation oder durch eine immobilisierte Fangsonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, auf einen festen Träger gebunden und über Einbau eines
20 detektionsmarkierten Nukleotids, durch Hybridisierung mit einer detektionsmarkierten Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, oder über eine Primer-Detektionsmodifikation nachgewiesen. In homogenen Reaktionsformaten erfolgte bisher der Nachweis z. B. über die Hybridisierung einer Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des
25 Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist und die einen gequenchten Fluoreszenz-Label trägt, wobei die Targetsequenz-abhängige enzymatische Aufhebung der Quenchung durch die Primer-Elongations-bedingte Freisetzung des gequenchten Fluoreszenz-markierten Nukleotids erfolgt (WO 92/02638), oder über die Anlagerung und/oder Interkalation eines detektierbaren Moleküls oder Gruppe.

Bei allen bisherigen quantitativen sensitiven und spezifischen heterogenen und homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten wurden bisher Nukleinsäure-Vermehrungseinheiten (Amplikons) verwendet, die neben den spezifischen Primer- und Sonden-Bindungssequenzen
5 zusätzliche Sequenzen variabler Länge zwischen den flankierenden Primer-Bindungssequenzen und der internen Sonden-Bindungssequenz enthielten. Diese fünfgeteilte Amplikonsstruktur resultierte in Amplikonlängen größer als die Summe der Sequenzlängen der beiden flankierenden Primer und der internen Sonde zwischen
10 vorzugsweise 100 und 1000 Basen(paaren). Optimierungen der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion durch verbesserte Enzymmischungen gingen bisher vielmehr hauptsächlich in Richtung längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte.

Kürzere Amplikonlängen wurden bisher lediglich zum Nachweis spezieller Sequenzen wie z. B. bei Triplett-Expansionen, für In-situ-Untersuchungen oder den Nachweis stark fragmentierter Nukleinsäuren im Rahmen der Altertumsforschung erzeugt. Diese kurzen
15 Amplikon-Längen wurden jedoch in zeitaufwendigeren Gelformaten oder In-situ-Formaten detektiert, die durch mangelnde Sensitivität und/oder fehlende Quantifizierung gekennzeichnet sind. Andere spezielle kurze Sequenzen wie Short Tandem Repeats, Short Interspersed Repetitive Elements Microsatellite Sequences oder HLA-spezifische Sequenzen wurden bisher lediglich als Primer- oder Sonden-
20 Bindungssequenzen verwendet, bzw. in Kombination mit anderen Sequenzen.

Die fünfgeteilten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben den Nachteil, daß sie neben den spezifisch Primer und Sonde bindenden Sequenzen noch zusätzliche Sequenzen beinhalten, die das Amplikon verlängern und die Gesamtspezifität im Hinblick auf die Spezifitäts-generierenden Primer- und Sonden-Bindungsreaktionen
25 reduzieren.

Die bisher verwendeten längeren fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben ferner den Nachteil längerer Primer-Elongationszeiten und damit längere Gesamt-Testzeiten. Die Sensitivität ist auch begrenzt durch Plateaueffekte der beteiligten Enzyme und Substrate, die bei längeren Amplikons früher erreicht werden. Ein weiterer

- Nachteil längerer Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte ist eine zunehmende
Kompetition zwischen Amplikon-Gegenstrang und Detektor- oder Fangsonde und somit
reduzierter Sensitivität. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Möglichkeit der
unspezifischen Bindung bedingt durch die zusätzlichen Sequenzen mit der Folge eines
5 erhöhten Hintergrunds und dadurch geringerer Sensitivität (geringeres Signal-Rausch-
Verhältnis). Ein weiterer Nachteil bei der Bindung des Nukleinsäure-
Vermehrungsprodukts an trägergebundene Fangsonden ist die sterische und kinetische
Hinderung längerer Nukleinsäure-Moleküle; daher werden Nukleinsäure-
Vermehrungsprodukte bisheriger Länge vor der Bindung durch die Fangsonde
10 vorzugsweise fragmentiert. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber
Fragmentierung innerhalb der Amplikonsequenz und dadurch Zerstörung der
Nukleinsäure-Vermehrungseinheit; dies führt zu geringerer Reproduzierbarkeit. Ein
weiterer Nachteil ist, daß längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei niedrigen
Testtemperaturen von z. B. 37 °C, die bei gängigen Nukleinsäure-Analysegeräten
15 vorgegeben sind, weniger spezifisch hybridisieren, da eine größere Differenz zur
Schmelztemperatur besteht. Ein weiterer Nachteil von fünfteiligen Nukleinsäure-
Vermehrungsprodukten ist beim Nachweis mehrerer verschiedener Nukleinsäure-
Vermehrungsprodukte, daß unterschiedliche Nukleinsäure-Vermehrungslängen gebildet
werden, die einen Multiplex-Nachweis erschweren.
- 20 Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives Nachweisverfahren für
Nukleinsäuren bereitzustellen, welches Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen
Verfahren hat.

- Eine spezielle Aufgabe der Erfindung bestand darin, ein targetabhängiges exponentielles
Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren zum hochsensitiven, hochspezifischen,
25 reproduzierbaren und quantifizierbaren Nachweis einer oder mehrerer einzelsträngiger
oder doppelsträngiger Nukleinsäuren bereitzustellen, welches insbesondere einen oder
mehrere der genannten Nachteile vermeidet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, unter Erhalt der Gesamtspezifität die Auswahl
der Primer- und Sondensequenzen so flexibel zu gestalten, daß eine Bestimmung

mehrerer verschiedener nachzuweisender Nukleinsäuren in einem vereinheitlichten Reaktionsformat unter Verwendung von vorzugsweise teilweise gleichen Primer- oder Sonden-Sequenzen möglich ist.

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure
- 5 enthaltend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C dieses Stranges im wesentlichen komplementär
- 10 ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die
- 15 Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Hilfe der Primer gebildeten Amplifikate eine Länge von weniger als 100 Nukleotide aufweisen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

- 20 In Fig. 1 ist schematisch die in der vorliegenden Beschreibung verwendete Bezeichnungsweise für die Bereiche auf der nachzuweisenden Nukleinsäure gezeigt.

- In Fig. 2 ist die entsprechende Bezeichnungsweise für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte der Primer sowie die Amplifikate (Amplikons) gezeigt. Ebenfalls ist gezeigt, daß die Amplifikate ein oder mehrere weitere Bereiche Y
- 25 aufweisen können, die außerhalb des Bereiches liegen, der die von der nachzuweisenden Nukleinsäure stammende Sequenzinformation enthält.

In Fig. 3 ist schematisch gezeigt, wie im Falle der vorliegenden Erfindung die Bindesequenzen der Primer und Sonde angeordnet sind. Es ergeben sich verschiedene

Alternativen I bis VI, je nachdem, ob und wie die Bindesequenzen überlappen. Es ist jeweils nur ein Strang des Amplifikats gezeigt. Dieselbe Anordnung (nur komplementär) kann für einen zweiten Strang des Amplifikats erstellt werden. Für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte ergibt sich ein ähnliches Bild. Als Fall V und VI ist der Fall gezeigt, daß die Sonde neben der Bindesequenz D noch weitere, nicht mit dem Amplifikat Basenpaarungen ausbildende Bereiche X enthält, die gleich oder verschieden sein können. Zum Vergleich ist der Fall des Standes der Technik als VII gezeigt; die Sequenzen Z repräsentieren die zusätzlichen Sequenzen der fünfteiligen Amplikons.

- 10 In Fig. 4 ist eine für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignete Region des HCV-Genoms gezeigt, sowie eine Sequenz, aus welcher die Primer- und Sonden- Sequenzen bevorzugt ausgewählt werden. Diese zweite Sequenz ist dem nicht humanpathogenen Virus HGBV-B entnommen. Bei den hieraus gewählten Primer- und Sondensequenzen handelt es sich daher um nicht für HCV spezifische
- 15 Sequenzen (J. Med. Virol. 48: 60-67).

In Fig. 5 sind weitere bevorzugte Primer und Sonden gezeigt.

In Fig. 6 und 7 sind weitere Primer und Sonden gezeigt.

- Fig. 8 zeigt den besonders bevorzugten HCV-Bereich, der ganz oder teilweise der Amplifikation als Templat zur Verfügung gestellt werden sollte. Danebenliegende
- 20 Sequenzen sollten nicht enthalten sein.

- Nukleinsäuren, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können, können beliebigen Ursprungs sein, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs oder von Hefen oder Pilzen. Proben, in denen die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement enthalten
- 25 sind, sind z. B. humane, tierische, bakterielle oder pflanzliche Flüssigkeiten, oder Flüssigkeiten aus Hefen oder Pilzen, Exkremente, Abstriche, Zellsuspensionen, Kulturen oder Gewebs-, Zell- oder Flüssigkeits-Punktionen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Damit das erfindungsgemäße Verfahren seine Vorteile

voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch eine durch Klonierung, Amplifikation, in-vitro- und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

- 5 Die nachzuweisende Nukleinsäure kann einzelsträngig (insbesondere bei RNA) oder ganz- oder teilweiseoppelsträngig (insbesondere bei DNA) sein. Für den Fall doppelsträngiger Nukleinsäuren können beide Stränge vermehrt werden oder aber auch nur einer. Aus beiden Sorten von Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige Amplifikate gebildet werden, wovon einer oder beide zum weiteren Nachweis
10 verwendet werden können. Entsprechend wird die Sequenz der Sonde oder der Sonden ausgewählt. Sie ist bevorzugt komplementär zu dem Strang des Amplifikats, der zum weiteren Nachweis verwendet wird.

- Der Probe oder einer Kontrollprobe können positive oder negative Kontrollnukleinsäuren oder Quantifizierungsstandards zugesetzt sein, die ähnlich oder
15 gleich behandelt werden wie die nachzuweisenden Nukleinsäuren (interner bzw. externer Standard, interne bzw. externe Kontrolle). Als Standards können beispielsweise interne oder externe heterologe oder homologe DNA- oder RNA-Standards, enthaltend Primer-Bindesequenzen homologe und zu den Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren heterologe Sonden-Bindesequenzen, verwendet werden. Umgekehrt ist
20 aber auch die Verwendung von besonders im 3'-Priming-Bereich heterologen Primer-Bindesequenzen und homologen Sonden-Bindesequenzen möglich. Als Negativ-Kontrollen werden bevorzugt analoge Specimen eingesetzt, welche die nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement nicht enthalten.

- Vor der Vermehrung wird die Probe bevorzugt einem oder mehreren Vorbehandlungsschritten unterzogen, um die nachzuweisenden Nukleinsäuren in eine
25 vermehrungsfähige Form zu bringen. In einem ersten optionalen Schritt findet eine Vorbehandlung der Probe (Specimen) statt, durch welche die Probe in eine Form gebracht wird, aus der die nachzuweisende Nukleinsäure in eine für die Überführung der

vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung geeignete Form gebracht wird (z.B. eine Abtrennung störender Bestandteile aus der Probe).

- Die Art der Vorbehandlung der Probe hängt von der Art der Probe und der Komplexität des biologischen Materials in der Probe ab. Bei humanen Körperflüssigkeiten, wie z. B.
- 5 Human-Blut, erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform zunächst eine Abtrennung von Blutzellen zur Erzeugung von Plasma, Serum oder Blutzellkonzentraten. Durch diesen Trennschritt wird durch die Probenvorbehandlung die Komplexität des biologischen Probenmaterials in den resultierenden Fraktionen deutlich reduziert, ohne daß eine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Im Fall von
- 10 Sputum oder Abstrichen erfolgt eine Probenvorbehandlung, z. B. durch Suspendieren des Sputums bzw. des Abstrichs in einer Flüssigkeit, im Fall von Urin z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Im Fall von Gewebspunktionen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendierung und Behandlung mit einem Zellverbands-auflösenden Agens. Bei Cerebrospinal-Flüssigkeit
- 15 erfolgt die Probenvorbehandlung z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Auch in diesen Fällen erfolgt durch die Probenvorbehandlung eine Reduktion der Komplexität des biologischen Probenmaterials.

- Danach kann sich ein Schritt anschließen, in dem die nachzuweisende Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung zugängliche Form überführt wird.
- 20 Dabei werden bevorzugt bekannte Methoden angewandt. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt eine Lysebehandlung der vorbehandelten Probe zur Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. durch Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali. In einem zweiten Schritt wird die durch Lyse vorbehandelte Probe nach
- 25 Zugabe von chaotropen Agentien, wie z. B. Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff, in An- oder Abwesenheit von löslichen Alkoholen, wie z. B. Isopropanol, an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger konzentriert. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen (z. B. Magnetpartikel, Glasvliese mit glashaltigen Oberflächen, Partikel,

- Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, Dip-sticks oder miniaturisierte Reaktionskammern, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können). Durch diesen festen Träger erfolgt bevorzugt eine nicht-sequenzspezifische Reinigung, d.h. keine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren von anderen
- 5 Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-(Nukleinsäuren-)Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäure, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen
- 10 zugängliche Form möglich.

- In einer anderen Ausführung kann die Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe nach Nukleinsäure-Freisetzung in einem ersten Schritt durch z. B. Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali erfolgen. In einem zweiten Schritt wird die
- 15 lysierte vorbehandelte Probe zur Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit festen Trägern in Kontakt gebracht, die mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Fangsonden spezifisch zur selektiven Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure modifiziert sind, und anschließend die gebundene nachzuweisende Nukleinsäure durch Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener
- 20 Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure wieder eluiert. Beispiele für Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen sind PNA-Homopyrimidin-Oligomere wie z. B. (T)₇-PNA oder Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Substanzen wie z. B. Nukleinsäure-Interkalatoren, Major groove-Binder oder Minor groove-Binder. Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind Nukleinsäure-
- 25 Oligomere oder Nukleinsäure-Polymere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Weitere Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind PNA-Oligomere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen oder der Fangsonden an den festen Träger kann mit oder

ohne Zwischenschaltung von Abstandshaltern (Spacern) entweder kovalent oder über Bindungspaare, wie z. B. Biotin:Streptavidin oder Ni:Chelat, erfolgen.

Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuresequenzen können linear oder zirkulär sein und können Sequenz-Modifikationen und/oder sonstige Modifikationen, wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-
5 Analoga oder Äquivalente davon, enthalten oder/und methyliert, gecappt, polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuren oder deren Komplement können natürlichen Ursprungs sein, fragmentiert, modifiziert oder enzymatisch, z. B. mit dem Enzym Uracil-Deglykosylase
10 (UNG), oder physikalisch vorbehandelt, vorvermehrt, oder chemisch, photochemisch oder enzymatisch erzeugt sein, z. B. durch chemische Oligonukleotidsynthese oder in-vitro-Replikation, in-vitro-Reverse Transkription oder in-vitro-Transkription.

In dem ersten essentiellen Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure amplifiziert. Im folgenden wird dieses
15 Teilstück auch Amplikon genannt. Dieses enthält zwingend den Sequenzbereich zwischen den äußeren Enden der Bindesequenzen A und C' bzw. des Komplements davon der Primer (den Primerbindungsbereichen), und enthält den Bindebereich E der Sonde bzw. das Komplement davon. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Amplikon (bevorzugt die Gesamtlänge der Sequenzen der Bereiche A, B und C) kürzer
20 als 100 Nukleotide, besonders bevorzugt kürzer als 60 Nukleotide, jedoch bevorzugt länger als 40 Nukleotide. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Gesamtlänge der Amplifikate nicht doch größer sein kann, z. B. wenn die Primer zusätzlich Nukleotide aufweisen, die nicht innerhalb der Bindebereiche liegen. Es werden solche Vermehrungsmethoden eingesetzt, die eine Vermehrung der nachzuweisenden
25 Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement erlauben, die in der Bildung von Tripartite-Mini-Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten münden [Mini Chain Reaction (MCR)]. Hierfür stehen prinzipiell alle Nukleinsäureamplifikationsverfahren zur Verfügung, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt werden targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Besonders bevorzugt werden

theoretisch exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet, bei denen eine antiparallele Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement erfolgt, wie z. B. Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR für Desoxyribonukleinsäuren, RT-PCR für

5 Ribonukleinsäuren). In besonderer Weise bevorzugt werden thermozyklische exponentielle Elongations-basierte Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die zur Vermehrung eingesetzten nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement können in Form von einzelsträngigen oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren oder

10 Ribonukleinsäuren vorliegen. Ziel der Vermehrungsreaktionen ist die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks der nachzuweisenden Nukleinsäure. Unter einem Amplifikat wird daher jede unter Verwendung von Sequenzinformation der Nukleinsäure hergestellte Molekülspezies verstanden. Insbesondere handelt es sich um Nukleinsäuren. Der Begriff "Amplifikate" beinhaltet sowohl einzelsträngige als auch

15 doppelsträngige Nukleinsäuren. Ein Amplifikat kann neben den die Sequenzinformationen der zugrunde liegenden Nukleinsäure enthaltenden Bereichen (Amplikon) außerhalb der voneinander wegweisenden Enden der Primerbindungsstellen noch weitere Bereiche enthalten, welche nicht in direkter Relation mit Sequenzen der zu amplifizierenden Nukleinsäure stehen. Bevorzugt kommen gerade solche Sequenzen

20 einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden nicht auf der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement vor und können mit dieser nicht durch direkte Basenpaarung hybridisieren. Amplifikate können somit entweder mit der nachzuweisenden Nukleinsäure selbst oder mit deren Komplement hybridisieren. Amplifikate sind beispielsweise auch die Produkte einer asymmetrischen Amplifikation, d. h. einer

25 Amplifikation, bei der die beiden Stränge in unterschiedlicher Menge gebildet werden (z. B. durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Primern) oder einer der beiden Stränge wieder zerstört wird (z. B. durch RNase).

Unter einem Primer im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Molekül verstanden, welches über Basenpaarungen an eine Nukleinsäure T oder deren Komplement binden

30 kann und welches, bevorzugt enzymatisch, verlängert werden kann. Bevorzugt sind

Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende unter Verwendung der nachzuweisenden Nukleinsäure oder einem Komplement hiervon als Templatnukleinsäure verlängert werden können. Als Primer können monovalente oder multivalente oder monofunktionelle oder multifunktionelle Agentien eingesetzt werden, die eine

5 Nukleinsäure-abhängige Elongation zulassen. Diese Agentien können auch aus verschiedenen Molekülarten zusammengesetzt sein, z. B. Chimären aus PNA und Nukleotid(en) oder aus Protein/Peptid und Nukleotid(en). Bevorzugt können als Primer Oligomere oder Polymere einer Bindelänge von zwischen 9 und 30 nt, besonders bevorzugt zwischen 11 und 22 nt verwendet werden, die an die nachzuweisende

10 Nukleinsäure T oder deren Komplement antiparallel binden und die als ein von mehreren Reaktionspartnern für eine enzymatische Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement wirken. Besonders bevorzugt werden als Primer Oligomere verwendet, die nach Zugabe eines Vermehrungsreagenzes durch Anlagerung zumindest eines Teils des Primers an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren

15 Komplement eine gerichtete Replikation einer oder beider Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement initiiert. Ein Beispiel für einen besonders bevorzugten Primer ist ein Desoxyribooligonukleotid mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

Die als Primer eingesetzten Agentien können prinzipiell weitere Gruppen enthalten, wie

20 z. B. Markierungen. Bevorzugt enthalten die Primer keine Modifikation, die später zur Detektion oder zur Immobilisierung der Amplifikate eingesetzt würde. Erforderlich ist, daß die Primer die geforderten Bindeeigenschaften zur nachzuweisenden Nukleinsäure bzw. ihrem Komplement haben und verlängerbar sind.

Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, welches aufgrund von Basen-Basen-

25 Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren hybridisieren kann und welches mit Hilfe der 5'-Nuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, Tth-Polymerase oder anderer Polymerasen mit 5'-Nuclease-Aktivität oder clonierte, mutierte oder chimäre Polymerasen mit 5'-Nuclease-Aktivität stückweise abgebaut werden kann. Bevorzugte Sonden sind daher Oligodesoxyribonukleotide. Die Länge einer Sonde beträgt, bezogen auf die

Bindesequenz D, bevorzugt zwischen 9 und 30 Basen. Die Sonde weist bevorzugt an unterschiedlichen Nukleotiden eine Reportergruppe, die Licht einer Wellenlänge absorbieren kann, und einen Quencher, der die eingestrahlte und von der Reportergruppe absorbierte Energie ganz oder teilweise übernehmen kann, sodaß eine Emission von Licht durch die Reportergruppe unterdrückt wird, auf. Details für die Herstellung einer solchen Sonde sowie die generellen Bedingungen für die Durchführung eines Nachweisverfahrens aufgrund dieses Prinzips sind in WO 92/02638, US-A- 5,210,015 sowie EP-A-0 699 768 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldungen sowie ihrer Äquivalente wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Unter einer Bindesequenz wird bevorzugt die Sequenz von Basen verstanden, die zwischen den äußersten, mit einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde über Basen-Basen-Wechselwirkung bindenden Basen einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde liegt, einschließlich dieser äußersten Basen.

Die als Sonde eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen D für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement, insbesondere jedoch für einen Strang des Amplifikats enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein, solange die Bindung an einen Strang des Amplifikats möglich ist, und ein Abbau durch eine 5'-Nuklease möglich ist. Die Reportergruppe liegt bevorzugt in 5'-Richtung von der Quenchergruppe in einer Entfernung, die ein effektives Quenchen noch erlaubt.

In der vorliegenden Erfindung wird das Teilstück der Nukleinsäure, von welchem eine Vielzahl von Amplifikaten hergestellt werden soll, so ausgewählt, daß es drei Bereiche A, B und C enthält. Die Bereiche A und C sind Bereiche, die so gewählt werden, daß

der eine Primer die Sequenz A als Bindesequenz benutzen kann und das Komplement des Bereiches C als Bindesequenz für den anderen Primer dienen kann. Unter einem Komplement wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine zu einer bestimmten anderen Nukleinsäure, z. B. einem Sequenzbereich z. B. eines Amplifikats oder der
5 nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz verstanden.

Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Basenpaarungen so gewählt sind, daß (für den Fall, daß eine Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure, z. B. einer Sonde oder einem Primer) eine Hybridisierung unter den Testbedingungen noch erfolgen kann
10 bzw. (für den Fall eines Verlängerungsprodukts eines Primers im Verhältnis zu dem eingesetzten Templat) die Nukleinsäure aufgrund einer Primerverlängerungsreaktion unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure gebildet werden konnte. Im wesentlichen komplementär bedeutet daher oft, daß unter stringenten Bedingungen mehr als 90 % der Basen der betrachteten Nukleinsäure bzw. Sequenz mit der bestimm-
15 ten Nukleinsäure bzw. Sequenz Basenpaarungen ausbilden.

Die Bereiche A und C sind erfindungsgemäß bevorzugt so lang, daß Bedingungen gefunden werden können, bei denen Primer einer entsprechenden Länge mit den Basen in diesen Bereichen hybridisieren können. Daher sind die Bereiche bevorzugt länger als 8, besonders bevorzugt länger als 12 Nukleotide. Auch bezüglich der Obergrenze der
20 Länge der Bereiche A und C ergeben sich im Sinne der Erfindung bevorzugte Bereiche. Die Bereiche A und C sind jeweils bevorzugt kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 20 Nukleotide. Die Länge der Bereiche wird in einem besonderen Aspekt der Erfindung dadurch nach oben begrenzt, daß die Primer in für die nachzuweisende Nukleinsäure unspezifischer Weise daran hybridisieren können sollen. Daher ist die
25 besonders bevorzugte Länge der Bindesequenzen A und C 12 bis 20 Nukleotide. Die Bereiche A und C auf der nachzuweisenden Nukleinsäure überlappen nicht miteinander.

Im Sinne der Erfindung enthalten das Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure (welches dem Amplikon entspricht) und somit die hieraus gebildeten Amplifikate eine zwischen den Bereichen A und C gelegene Sequenz B (Fig. 1 bis 3). Diese Sequenz hat

- eine Länge von ein oder mehr Nukleotiden, bevorzugt mehr als 4, besonders bevorzugt mehr als 8 Nukleotide. Nach oben hin ist die Länge der Sequenz B durch die geforderte Gesamtlänge des Amplifikats begrenzt. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Sequenz B keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz der Sonde zugehören.
- 5 Bevorzugt ist die Sequenz B daher kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 15 Nukleotide. Die Sequenz B hat bevorzugt eine Länge von zwischen 4 und 30 Nukleotiden. Besonders bevorzugt ist die Länge der Sequenz B zwischen 8 und 15 Nukleotiden. Diese Sequenz oder das Komplement davon dienen im Sinne der Erfindung mit zur Bindung der Sonde. Die Länge der Sonde wird so gewählt, daß eine
- 10 Hybridisierung mit dem Amplifikat möglich ist. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, daß sie eine Bindesequenz D enthält, welche durch die mit dem Amplikon Basen-Basen-Wechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde, insbesondere den zwischen den äußersten mit korrespondierenden Basen des Amplikons Basenwechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde definiert ist. Bevorzugt ist
- 15 die Sonde im wesentlichen komplementär zu den Nukleotiden der Bindesequenz E des Amplifikats. Die Bindesequenz D bzw. D' kann zu dem Amplifikat zu 100 % komplementär sein, aber auch Mismatches zwischen den äußeren Enden der Bindesequenz aufweisen. Die Sonde kann neben der Bindesequenz weitere Gruppen oder Reste oder auch Nukleinsäure-bindende Bereiche enthalten (Fig. 3, V, VI).
- 20 Abhängig von der Länge des Bereiches B und der Länge der Bindesequenz D bzw. D' lassen sich unterschiedliche Fallgestaltungen treffen. In einem ersten Fall ist die Bindesequenz D oder D' länger als der Bereich B bzw. B' des Amplikons. In diesem Fall reicht die Bindesequenz D bzw. D' in einen oder beide Bereiche A bzw. A' und C bzw. C' des Amplikons hinein. Diese Fälle sind in Fig. 3, II bis IV gezeigt. In diesen Fällen
- 25 enthält das Amplifikat zwischen den voneinander wegweisenden Enden der Bereiche A und C keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz E oder den Bindesequenzen der Primer zugehören. Die Bindesequenz D der Sonde überlappt in Fig. 3, II und III mit einer der beiden Bindesequenzen der Primer.

In einem weiteren Fall entspricht die Länge des Bereiches B der Länge des Bereiches D, so daß die Bindesequenz der Sonde nicht mit den Bindesequenzen der Primer überlappt (Fig. 3, I). Bevorzugt im Sinne der Erfindung überlappt der Bereich D bzw D' nicht mit dem in 5'-Richtung gelegenen Bereich A, A', C oder C'.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet in einer bevorzugten Ausführungsform die Bildung von dreiteiligen Mini-Amplikons (Tripartite-Mini-Amplikon), die neben den Primer und Sonde bindenden Sequenzen keine zusätzlichen Sequenzen aufweisen und somit die Nachteile bei Bildung von längeren Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten vermeiden, wobei andererseits die Spezifität des gesamten Amplifikationsformats durch
- 10 Bindung der Primer, durch Bindung der Sonde und durch Ablauf der targetabhängigen enzymatischen Elongationsreaktion mit allen 4 Nukleotid- bzw. Basenspezifitäten oder natürlicher oder artifiziieller Analoga, Isomere oder Äquivalente davon aber sichergestellt wird. Das erfindungsgemäße Vermehrungsverfahren wird daher auch als Mini-Chain-Reaction (MCR) bezeichnet.
- 15 Die Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement erfolgt, wenn im folgenden nichts anderes ausgesagt ist, unter Befolgung der dem Fachmann bekannten Reaktionsschritte und Reaktionsbedingungen. Ein Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren ist der Einsatz der speziell ausgewählten Primer und Sondensequenzen, welche die Bildung und Vermehrung des Mini-Tripartite-Amplikons erlauben. Wesentlich im Sinne der Erfindung ist die Zugabe von einem oder mehrerer
- 20 Primer, die an die Primer-Bindesequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure, des Tripartite-Mini-Amplikons beziehungsweise deren Komplemente binden.

Allgemein üblich ist die Zugabe zur Vermehrung befähigender Vermehrungsreagentien. Bevorzugt können als Vermehrungsreagentien enzymatisch aktive Komponenten

- 25 (z. B. Enzyme) in Kombination mit Elongationssubstraten und geeignete Hilfsreagentien (wie Puffer) verwendet werden. Bevorzugte Elongationssubstrate sind Nukleinsäurebausteine oder natürliche oder artifiziielle Analoga oder Isomere oder Äquivalente davon. Als Elongationssubstrate werden Agentien eingesetzt, die zum Aufbau eines Gegenstrangs der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignet sind.

Bevorzugt werden als Elongationssubstrate Nukleotide eingesetzt. Bevorzugte Nukleotide sind dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP, dITP, iso-dGTP, iso-dCTP, deaza-dGTP und ATP, GTP, CTP, UTP und/oder ITP, deazaGTP, iso-GTP, iso-CTP.

Besonders bevorzugt werden im Fall der PCR als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien
5 Mischungen aus meta- oder thermostabilen enzymatischen DNA-Polymerase-Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und/oder Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagenzien verwendet, z. B. T.aq.-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Besonders bevorzugt werden im Fall der RT-PCR als Vermehrungsreagentien Mischungen, Komplexe oder Domänen aus thermostabilen
10 enzymatischen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Mischungen aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase.

Bei den thermozyklischen Vermehrungsreaktionen (z. B. PCR, RT-PCR) werden 2-
15 oder 3-phasige Zyklen durchgeführt, bevorzugt 2-phasige Zyklen. Bei den 2-phasigen Zyklen wird die Strangtrennung der Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei hoher Temperatur, bevorzugt 85 °C - 95 °C, durchgeführt, das gemeinsame Primer- und Sonden-Annealing und Primer-Elongation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt zwischen Primer und Elongationsgegenstrang bzw. Primer und Sonde und Elongations-
20 gegenstrang, bevorzugt zwischen 48 °C und 72 °C. Die Strangtrennung erfolgt durch Energiezufuhr und/oder enzymatisch, bevorzugt durch erhöhte Temperatur, Mikrowellen oder das Anlegen einer Spannung über eine Mikroelektrode, besonders bevorzugt durch erhöhte Temperatur. Es werden bis zu 80 Thermozyklen durchgeführt, bevorzugt bis zu 60 Zyklen. Es wird bis zu 4 Stunden inkubiert, bevorzugt 30 - 120
25 Minuten. Die Vermehrungsreaktion kann in Reaktionsgefäßen, Kapillaren oder miniaturisierten Reaktionskammern erfolgen, die auch Teil eines integrierten Reaktionschips sein können. Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der Amplifikationsreaktion kontinuierlich oder innerhalb kurzer Zeitintervalle, bevorzugt mehrfach während eines Temperaturcyclus, besonders bevorzugt 3fach oder öfters

während eines Temperaturcyclus. Die Vermehrungsreaktion kann eine interne Kontrolle und/oder Kalibrator enthalten. Die Kontrolle kann auch extern durch eine zusätzliche Vermehrungsreaktion erfolgen.

Bei Verwendung von dUTP anstelle von oder in Ergänzung zu dTTP wird durch die
5 DNA-Polymerase-Aktivität dUMP anstelle von dTMP in die vermehrte
Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement eingebaut. Dies erlaubt durch Inkubation
mit der Enzymaktivität Uracil-Deglycosylase, bevorzugt mit einer thermolabilen
Ausführungsform der Enzymaktivität, bei der die Renaturierung nach thermischer
Denaturierung der Enzymaktivität langsamer erfolgt, die Fragmentierung des Vermeh-
10 rungsprodukts und somit seiner Eigenschaft als Nukleinsäure-Vermehrungseinheit. Die
Inkubation des UMP-haltigen Vermehrungsprodukts kann im Anschluß an die
Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktion (Sterilisierung) und/oder vor einer
erneuten Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion (Carry over-Prävention) erfolgen.

Alternativ können auch Psoralen und/oder Isopsoralen und Derivate davon und
15 Bestrahlung mit UV-Licht zur funktionellen Inaktivierung des Nukleinsäure-
Vermehrungsprodukts verwendet werden.

Der Nachweis der Bildung der Amplifikate erfolgt mit der Sonde, die an die Binde-
sequenz B des Amplikons zu einem Hybrid bindet. Die wirkt als Substrat zur
Freisetzung einer Reportergruppe aus ihr. Die Enden der Bindesequenz der Sonde liegen
20 zwischen den äußeren Enden der Primer-Bindesequenzen. Die Sonde ist somit
hybridisierbar mit einem Strang des Amplifikats.

Die Bindung der Sonde kann unter Benutzung bekannter Bedingungen geschehen. Denn
bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle
Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem
25 Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit
experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf
"Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press,
1986, z. B. in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of

Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten Methoden gehört auch die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden und die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die unter anderem vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt.

Die Sonde wird im erfindungsgemäßen Verfahren entweder vor oder während der Amplifikationsreaktion zugegeben, bevorzugt in Form einer Lösung, gewünschtenfalls zusammen mit den Primern. Dabei werden Reagenzbedingungen eingestellt, die eine Hybridisierung der Sonde mit einem Amplifikat erlauben.

Die Bindung zwischen der vermehrten Nukleinsäuresequenz des Amplikons und/oder dessen Komplement und der Sonde erfolgt während der Amplifikation, sodaß das Enzym bei der Verlängerung eines Primers die Sonde von ihrem 5'-Ende her abbauen kann. Hierdurch wird die Reportergruppe freigesetzt, bevorzugt in Form von Mononukleosidbausteinen. Dadurch wird der Quenchprozess unterbunden und die Reportergruppe kann Licht emittieren, welches als Signal gemessen wird und als Zeichen für die Anwesenheit der Nukleinsäure verwendet wird.

Bei Verwendung mehrerer Sonden oder multifunktionaler Sonden oder Sonden, die mehrere Bindesequenzen für Amplifikate verschiedener nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplemente aufweisen, können mehrere unterschiedliche Amplifikate oder deren Komplemente gebunden werden. Dabei erlaubt die Bildung von Tripartite-Mini-Amplikons bevorzugt ähnlicher Länge, besonders bevorzugt solcher Tripartite-Mini-Amplikons gleicher Länge, bei der Nukleinsäurevermehrung die Einstellung vereinheitlichter Inkubationsbedingungen für die Bildung der unterschiedlichen Bindekomplexe. Dies erlaubt den parallelen und/oder sequentiellen Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen im Rahmen von Multiplex-Verfahren. Unter einem Multiplex-Amplifikationsverfahren wird meist ein Verfahren verstanden,

bei dem entweder unterschiedliche Sequenzen auf einer Nukleinsäure (z. B. unterschiedliche Regionen eines Gens) oder aber unterschiedliche Sequenzen auf unterschiedlichen Nukleinsäuren, z. B. aus unterschiedlichen Organismen, z. B. unterschiedlichen Viren, gleichzeitig in einer Amplifikationsmischung vermehrt
5 werden. Solche Verfahren stellen hohe Anforderungen an die Reaktionsbedingungen, da für eine zuverlässige Auswertung die Amplifikationen für die unterschiedlichen Sequenzen eine ähnliche Amplifikations-Effizienz haben müssen. Einen der Einflußfaktoren für unterschiedliche Effizienz auszuräumen, ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dazu unterscheiden sich die Ampliconlängen bevorzugt um
10 nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt um nicht mehr als 5 Nukleotide.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiplexverfahrens werden Amplicons der verschiedenen Sequenzen hergestellt und anschließend die Summe der gebildeten Amplicons bestimmt. Dabei wird bevorzugt ein Nachweisverfahren eingesetzt, bei dem eine Markierung für alle Nachweise verwendet
15 werden kann; so können beispielsweise alle Sonden für die einzelnen Amplifikate gleich markiert sein, z. B. mit dem gleichen Ruthenium-Komplex. Dieses Vorgehen ist insbesondere für Tests in Proben aus Blutbanken vorteilhaft, da es bei der weiteren Verwendbarkeit der Proben für Blutspenden nicht auf die Art einer Infektion ankommt, sondern die Probe schon dann nicht mehr als Blutspendematerial in Frage kommt, wenn
20 irgendeine getestete Infektion (z. B. HIV oder HBV) vorliegt.

Bei den Multiplex-Amplifikationsverfahren unterscheidet man zwischen echten und unechten Multiplex-Verfahren. Bei unechten Verfahren werden die Primer aus stark konservierten Regionen der Analytnukleinsäuren ausgewählt, derart, daß mit dem einen Set von (2) Primern alle nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden.
25 Bei echten Multiplex-Verfahren wird ein Gemisch von mehr als 2 Primern eingesetzt, von denen mindestens 2 eine unterschiedliche Selektivität haben. Einer oder mehrere der Primer können für alle oder ein Unterset von nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifisch sein. Dieses Verfahren ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn wenig verwandte Sequenzen nebeneinander amplifiziert werden sollen.

Mit Multiplex-Verfahren können verschiedenste Kombinationen von nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen nebeneinander amplifiziert werden, z. B. verschiedene Subtypen eines Virus oder Bakterien verschiedener Genera oder Spezies.

- Der Nachweis der freigesetzten Reportergruppe kann in für den Fachmann bekannten
5 Verfahren, insbesondere in verschiedenen Ausführungsformen erfolgen, bevorzugt basierend auf Fluoreszenzmessungen.

- Im Fall der gequenchten Fluoreszenzmarkierungen erfolgt eine Fluoreszenzaktivierung durch Dequenching nach Bindung der Detektions-Sonde an das entstehende Tripartite-Mini-Amplikon und 5'-nukleolytischer Abbau und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten Nukleotids. Die Messung der resultierenden
10 Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils bevorzugt durch Real time-Messungen. In einer besonderen Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Fluorescein und Rhodamin oder Derivate davon als Fluoreszenz- und Quencher-Komponenten verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektor-
15 sonden Ruthenium- oder Rhenium-Chelate und Quinone oder Derivate davon als Elektrochemilumineszenz- und Quencher-Komponenten verwendet.

- Besonders bevorzugt im Sinne dieses ersten Aspekts der Erfindung sind solche Ausführungsformen, bei denen mindestens eine der Bindesequenzen der Primer und der Sonde nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. Spezifisch im Sinne
20 der Erfindung ist eine Sequenz dann, wenn sie aufgrund einer fortlaufenden Sequenz von Nukleobasen prinzipiell in der Lage wäre, unter stringenten Bedingungen nur mit einer Sequenz auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch mit Nukleinsäuren anderer, nicht nachzuweisender Organismen oder Spezies oder Gruppen von Organismen zu binden. Bevorzugt ist eine Sequenz dann nicht für eine Sequenz
25 spezifisch, wenn sie unter den Bedingungen, welche für die Durchführung des Nachweises eingestellt werden, mit anderen Nukleinsäuren hybridisiert.

Homologien zu anderen Genomen (Sequenzen) lassen sich mit Hilfe einer definierten Ausgangssequenz identifizieren. Verwendet wird eine z. B. über das Internet für jeden

zugängliche Suchmaschine mit Namen "BLAST" (Basis Local Alignment Search Tool) (Homepage-Adresse: ><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/><).

Diese ermöglicht den Zugriff auf diverse andere Sequenz- und Proteindatenbanken, von denen als am wesentlichsten zu benennen sind:

- 5 GenBank, EMBL, DDJB, PDB, PIR und Swiss-Prot.

Es werden auch BLASTN-Verfahren gemäß Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 im Rahmen von UWGCG Suchverfahren verwendet.

- Die Suchverfahren werden auch auf Sequenzdatenbanken wie z.B. die EMBL-Sequenzdatenbanken, bevorzugt auch virale Sequenzdatenbanken wie z.B. em-vrl
10 angewandt.

- Das Blast-Programm bietet dem Anwender zahlreiche Anpassungsmöglichkeiten, um eine individuelle Suche ausführen zu können, d. h. solche Sequenzen zu identifizieren, die für einen oder mehrere Analyten spezifisch sind, oder die eben nicht spezifisch sind, d. h. auch in anderen Organismen vorkommen oder nicht. Hierzu wird auch verwiesen
15 auf Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 403-410.

- Erstaunlicherweise ergibt sich nämlich die Selektivität des Nachweisverfahrens nicht allein aus der Selektivität der einzelnen Primer für ein spezifisches Target, sondern aus der kumulierten Selektivität des Gesamtsystems. So können sogar zwei Primer oder
20 zwei Primer und eine Sonde, einzeln völlig unselektiv sein, d. h. einzeln mit einer Vielzahl von Targets hybridisieren; dadurch, daß sich die Selektivitäten der einzelnen Primer und Sonde (nur) in der nachzuweisenden Nukleinsäure überlagern, ist eine Gesamtspezifität gegeben. Dadurch, daß man auf die Selektivität der Primer aber bei der Auswahl der zu amplifizierenden und nachzuweisenden Nukleinsäure nicht so sehr fest-
25 gelegt ist, ist es viel besser möglich, für unterschiedliche Targets kurze Amplicons zu lokalisieren, die in ihrer Länge vollständig oder weitgehend (d. h. über 95 %) übereinstimmen. Dies macht Simultan-Amplifikationen und -Hybridisierungen (wie im Falle von Nukleinsäuresondenarrays) besser realisierbar und reproduzierbar.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens. Dieses enthält die Primer und bevorzugt auch eine Nachweissonde. Es kann jedoch auch weitere Reagenzien, wie Puffer und Enzyme, z. B. eine Polymerase, enthalten.

- 5 Bevorzugt binden die Primer an die Bindesequenzen A bzw C', wie oben beschrieben, und die Sonde an einen zwischen den Enden der Bindesequenzen A und C' gelegenen Bereich B oder das Komplement davon.

Auch bei der Verwendung von mindestens einer Sequenz aus den 3 Sequenzbereichen der beiden Primer und der Sonde, die nicht spezifisch für die nachzuweisende

- 10 Nukleinsäure ist, bleibt die Gesamtspezifität des Nachweisverfahrens erhalten. Ist eine der Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, sondern bindet auch an andere Nukleinsäuren, kann kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, da die zweite Primerbindungssequenz fehlt. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte auf
- 15 der anderen Nukleinsäure werden nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist auch die zweite Primersequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann nur dann ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, wenn beide Primerbindungssequenzen in der gleichen Nukleinsäure-Vermehrungseinheit sind.
- 20 Dieses Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt wird ebenfalls nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist die Sondensequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, jedoch die beiden Primer spezifisch, werden keine Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure gebildet. Ist zusätzlich zur Sondensequenz auch eine der beiden Primersequenzen nicht spezifisch
- 25 für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann wiederum kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet werden. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure, die möglicherweise gebildet werden, enthalten andere Sequenzen im Sondenbindungsbereich und werden daher nicht detektiert. Sind alle drei Bindungssequenzen für die beiden Primer und die

Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, wird kein Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt gebildet, wenn mindestens eine der beiden Primersequenzen nicht in einer Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der anderen Nukleinsäure liegt. Liegt die Sondensequenz nicht in der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der beiden

5 Primersequenzen für die andere Nukleinsäure, kann zwar ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet, aber nicht detektiert werden. Der einzige Fall, daß ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet und detektiert werden kann, ist, wenn alle drei Sequenzen innerhalb eines Nukleinsäure-Vermehrungsbereichs liegen. Dies kann jedoch durch ent-

10 sprechende Sequenzauswahl der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit vermieden werden, z. B. indem die Primerhybridisierungsstellen nicht gleichzeitig aus demselben Locus desselben nicht nachzuweisenden Organismus gewählt werden.

Eine weitere Möglichkeit, Primer und Sonden gezielt unselektiv zu machen, besteht in der Verwendung degenerierter Basen innerhalb der Sequenz. Dabei wird

15 zweckmäßigerweise die Region, in der die Hybridisierung der Targetnukleinsäure mit dem Primer oder der Sonde stattfinden soll, so gewählt, daß relativ wenig Unterschiede zwischen der Targetsequenz und einer anderen, jedoch nicht nachzuweisenden Sequenz (z. B. eines anderen Mikroorganismus) bestehen. Die noch bestehenden Unterschiede können durch den Einsatz degenerierter Basen an den differierenden Basenpositionen

20 weitgehend ausgeglichen werden. So lassen sich Unterschiede von Primern (A bzw. G) durch den Einbau der Base P (6H, 8H-3,4-dihydro-pyrimido[9,5-C][1,2]oxazin-7-on, z. B. Nucleic Acids Research, Vol. 17, 24, 1989, p. 10373-10383) ausgleichen. Dasselbe gilt für Pyrimidine mit der Base K (Nucleotides & Nucleotides, 16 (7-9), 1507-1511 (1997)). Eine noch stärkere Degenerierung ist durch den Einsatz von Inosin möglich (US-

25 A-5,585,477; US-A-5,691,134; US-A-5,578,467; J.Biol.Chem. 260, 5, 2605-2608, 1985; Nucl.Acids Res. 1995, 23, 13, 2499-2505), da Inosin Basenpaarung mit allen vier Basen erlaubt.

Eine weitere Möglichkeit, nichtkomplementäre Basen einzusetzen, ist der Ersatz von A durch D (Diaminopurine oder/und der Ersatz von C durch M (Methylcytosin).

In einer weiteren Ausführungsform findet die Herstellung der Amplifikate unter Einsatz von Nukleotiden, besonders bevorzugt Mononukleotiden, welche jeweils zu A, G, C und/oder T komplementär sind, statt. Bevorzugt enthält der Bereich B bzw. B' der nachzuweisenden Nukleinsäure alle 4 natürlichen Nukleobasen.

- 5 Ein technischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß bei Mehrfachbestimmungen einer Probe ein hoher Grad an Übereinstimmung der Meßwerte erreicht wird.

- Im folgenden sollen die beiden Aspekte der vorliegenden Erfindung anhand eines Nachweises für HCV beschrieben werden. Die Nukleinsäuresequenz von HCV ist
10 beispielsweise in EP-B-0 318 216 beschrieben. In FIG. 4 ist ein Ausschnitt aus einem HCV-Genom gezeigt, welches Grundlage des beispielhaft gezeigten Verfahrens ist. Die Sequenz aus HGBV-B, die der HCV-Sequenz entspricht und aus der die Sequenzen für die Primer und Probes entnommen sind, sind ebenfalls in FIG 4 gezeigt.

- Der Nachweis von HCV-RNA ist überraschenderweise trotz der kurzen vermehrten
15 Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure auch spezifisch und reproduzierbar in positiven HCV-Plasmaproben möglich, in denen die HCV-RNA nicht sequenzspezifisch vorgereinigt wurde, sondern direkt aus lysierten und über Glasoberflächen aufkonzentrierten Plasmaproben eingesetzt wurde. HCV-negative Plasmaproben ergeben kein Signal. Dies ist insofern überraschend, da das HCV-RNA-Genom sehr
20 labil ist gegenüber Fragmentierung in Plasma-Lysaten. Mit z. B. HIV-Plasmaproben, HBV-Serumproben, Chlamydiaprobe aus Urin oder Human-DNA-Proben aus Vollblut, die ebenfalls über Glasoberflächen aufkonzentriert wurden, wird mit den eingesetzten Primern und Sonden ebenfalls kein Signal erhalten.

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um einen oder mehrere der
25 für den Stand der Technik geschilderten Nachteile zu vermeiden oder um einen oder mehrere der folgenden Vorteile zu realisieren. Die PCR-Zyklen können sehr viel kürzer sein. Die Gesamtzeit der Nachweisverfahren kann dadurch verkürzt werden. Die Sensitivität des Nachweises kann erhöht werden, da weniger Konkurrenz/Verdrängung

- zwischen dem kurzen Gegenstrang des Amplikons und der Detektorsonde stattfinden kann. Die Spezifität des Nachweises wird erhöht, da der relative Anteil der internen Detektorregion gegenüber der gesamten Amplikonlänge erhöht wird. Die Differenzierbarkeit von Subtypen kann erhöht werden. Der Nachweishintergrund kann gesenkt
- 5 werden, da kurze Amplika weniger Potential für unspezifische Hybridisierung mit sich bringen. Aus diesem Grund kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann erhöht werden, da kleinere Targetregionen auf RNA-Genomen weniger sensitiv für RNA-Abbau sind. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen werden reduziert.
- 10 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Allgemeines

Alle verwendeten Oligonukleotide sind linear und einzelsträngig.

Beispiel 1

Nachweis von HCV aus menschlichem Blut

5 a) Probenvorbereitung:

Die RNA-Isolierung aus Plasma erfolgte anhand folgenden Probenvorbereitungsprotokolls:

1. Plasma (420 µl) mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) mischen und einige Sekunden vortexen
- 10 2. Zugabe von 500 µl Lysepuffer (inkl. 1 µg Carrier-RNA (polyA)/ml): 5,4 M Guanidinium-Thiocyanat; 10 mM Harnstoff; 10 mM Tris-HCl; 20 % Triton X 100; pH 4,4
3. vortexen und anschließend 10 min bei RT schütteln
4. Zugabe von 500 µl Isopropanol-MGP (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol)
- 15 5. vortexen und anschließend 20 min bei RT schütteln
6. Magnetseparation der MGPs
7. Überstand abnehmen und verwerfen
8. Zugabe von 750 µl Waschpuffer: 20 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 70 % Ethanol
- 20 9. MGPs auf Vortex resuspendieren und erneute Magnetseparation
10. Waschvorgang insgesamt 5mal wiederholen
11. Zugabe von 100 µl DEMC-Wasser zur Elution
12. 15 min bei 80 °C schütteln

13. Magnetseparation

14. 10 µl des Eluats in die RT-PCR einsetzen

b) Klonierung und Präparation des RNA-Standards:

Der Wildtypstandard "pHCV-wt" wurde zunächst durch Amplifikation eines Abschnitts
5 des HCV-Genoms mit den Primern KY80 (5'-gcagaaagcgtctagccatggcgt-3',
SEQ.ID.NO.1) und KY78 (5'-ctcgcaagcaccctatcaggcagt-3', SEQ.ID.NO.2) gewonnen
und das Amplikon anschließend über eine sog. "blunt-end"-Klonierung in den Vektor
pBluescript SK+ kloniert. Nach Vermehrung der bakteriellen Zellen wurde das Plasmid
isoliert, durch restriktionsenzymatischen Verdau linearisiert und über eine in-vitro-
10 Transkription das entsprechende RNA-Fragment gewonnen und aufgereinigt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei
260 nm.

Alle hier beschriebenen molekularbiologischen Verfahren können einschlägigen
Methodik-Büchern entnommen werden (e.g. Maniatis et al.; Ausubel et al.).

15 c) RT-PCR assay:

Die Amplifikation erfolgte analog zu dem in EP-A-0 699 768 beschriebenen Verfahren.
Weitere Details zur Konstruktion von Sonden für fluorogen markierte Sonden für das
TaqMan™-Verfahren sind in der Produktbeschreibung für die Geräte TaqMan™ LS-
50B und ABI Prism 7700 von Perkin Elmer beschrieben. Die Versuche wurden
20 vorgenommen mit folgenden Primer- und Sondensequenzen:

forward Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 390 und 417,
reverse Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 421 und 448,
Sonde: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 408 und 440, alle bezogen
auf die HGBV-B Sequenz aus der Sequenz HG22304 erhältlich aus der EMBL-
25 Datenbank em-vrl, oder aus Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995, 92, 3401-3405 und/oder
aus J. Virlo. 69: 5621-5630. Die in Figur 4 gezeigte Sequenz entspricht den Positionen

390 bis 448 dieser Sequenz, so daß die Primer- und Sondenpositionen direkt umrechenbar sind.

Bevorzugte Primer-/Sonden-Kombinationen ergeben sich folgendermaßen:

forward-Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 390-406, 390-408, 391-406, 391-408, 392-406, und 392-408,

reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 427-448, 427-447, 427-446, 428-448, 428-447, 428-446, 429-448 und 429-447,

Sonde ausgewählt aus einer der Sequenzen: 408-436, 408-435, 408-434, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, 408-428, 409-436, 409-435, 409-434, 409-433, 409-432, 409-431, 409-430, 409-429, 409-428, 410-436, 410-435, 410-434, 410-433, 410-432, 410-431, 410-430, 410-429, und 410-428, oder, bevorzugt:

forward-Primer: Sequenz von 390-406, 390-408, 391-406, 391-408, 392-406, und 392-408,

reverse Primer: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445, 423-444,

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 409-433, 409-432, 409-431, 410-433, 410-432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, und 408-428 oder, besonders bevorzugt:

forward Primer: Sequenz von 390-406, 391-406, und 392-406,

reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445, 423-444,

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 409-433, 409-432, 409-431, 410-433, 410-432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, und 408-428 .

Beispiel 2:

Gemäß Beispiel 1 wurden auch die in Fig. 5 gezeigten Primer und Sonden eingesetzt. Dabei sind die letzten 3 Sequenzen als ihr Komplement angegeben (Sonden bzw.
5 reverse Primer). Die erste Sequenz ist der forward primer, in der 2. bis 4. Zeile ist die Sequenz der Taq Man-Sonden angegeben. Die Zeilen 5-8 zeigen die Amplicons.

Beispiel 3:

10

Weitere mögliche Primer-Kombinationen sowie eine zu dem daraus gebildeten Amplicon korrespondierende HCV-Genomsequenz sind in Fig. 6 und 7 gezeigt. Hierbei sind die Kombinationen CK12-2/CK23-1/CK42 sowie CK11-1/CK21-1 und CK22-1/CK39 bevorzugt. Die gezeigte HCV-Genomsequenz hat sich für die Konstruktion von
15 Primern und Sonden als besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung erwiesen. In der letzten Zeile ist jeweils auch die zugehörige HGBV-B Sequenz gezeigt. Die Primer und Probes enthalten im gezeigten Falle Nukleotide mit gezielter Degenerierung. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Oligonukleotide ohne Degenerierung nicht auch zur Amplifikation von HCV geeignet sein können.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und
 - Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist,
- 15 dadurch gekennzeichnet, daß die mit Hilfe der Primer gebildeten Amplifikate eine Länge von weniger als 100 Nukleotide aufweisen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer der Bindesequenzen der Primer nicht überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
20 daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der Bindesequenzen von dem von der Bindesequenz der Sonde wegweisenden Teil der Bindesequenz des einen Primers bis zu dem
25 ebenfalls von der Bindesequenz der Probe wegweisenden Teil des anderen Primers kleiner ist als 60 Nukleotide.

5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

09/530747

Fig. 1

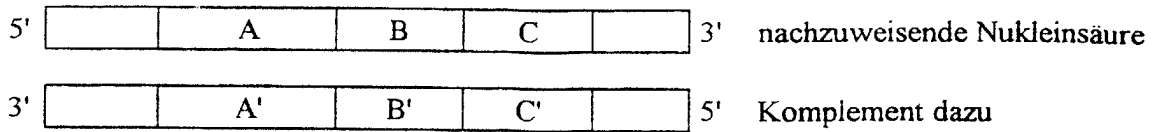


Fig. 2

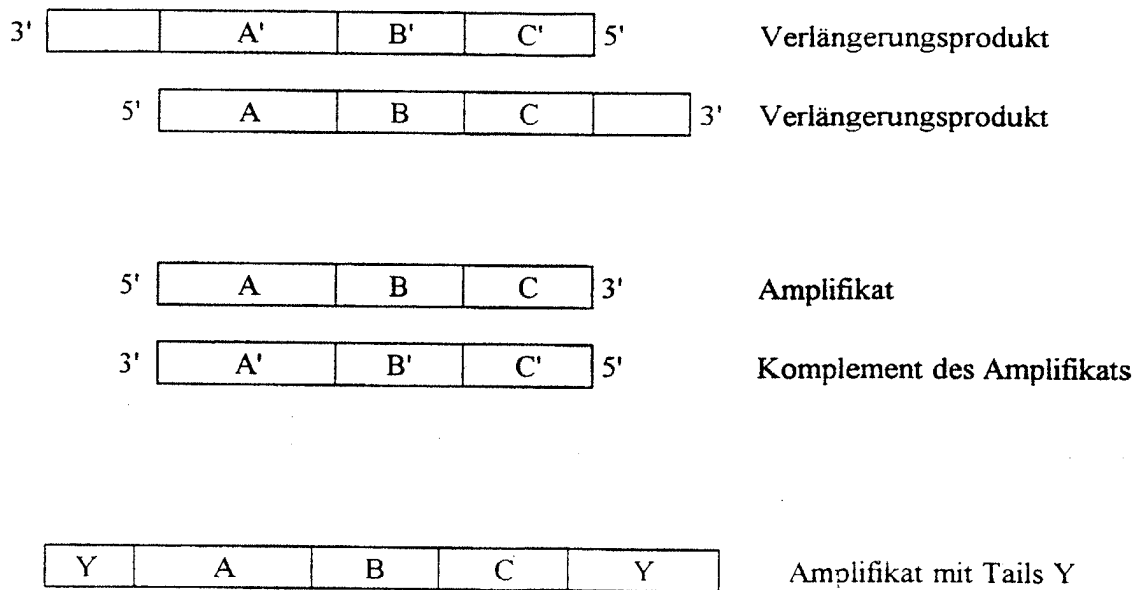


Fig. 3

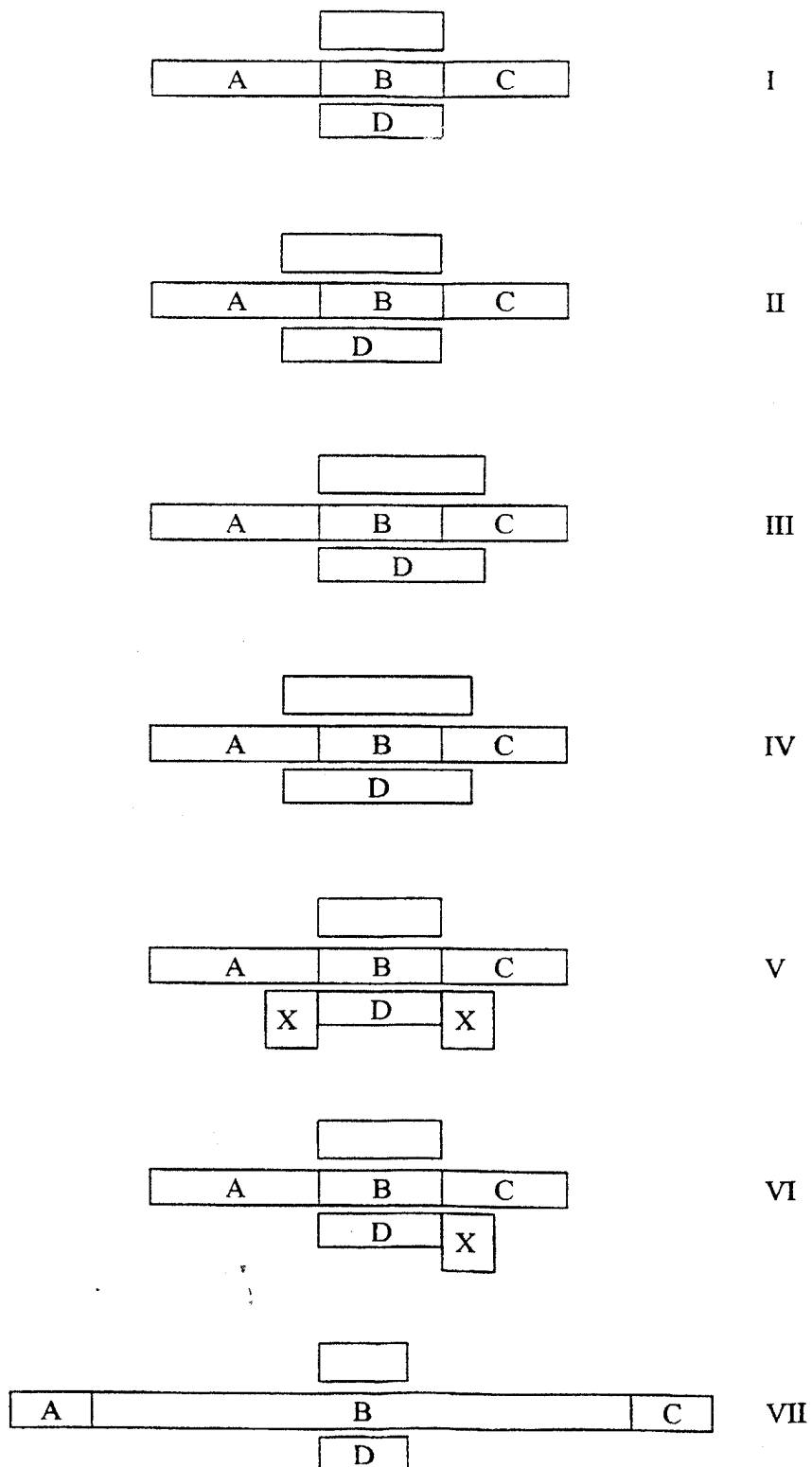


Fig. 4

HCV:

5'-GTACTGCCTG ATAGGGTGCT TGCGAGTGCC CCGGGAGGTC TCGTAGACCG
TGCACCATG-3'

HGBV-B:

5'-GTACTGCCTG ATAGGGTCCT TGCGAGGGGA TCTGGGAGTC TCGTAGACCG
TAGCACATG-3'

FIG 5

HCV_MCR01	AGTATGTGTGTCGTGCAGCC	
MPF1		CCAGGACCCCCACTCCCCGG
MPF1+1		TCCAGGACCCCCACTCCCCGG
MPF2		CCAGGACCCCCACTCC
HCV_1A	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCCGGGAGAGCCA	
HCV_1B	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCCGGGAGAGCCA	
HCV_2B	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCCGGGAGAGCCA	
HCV_MCR	AGTATGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCACTCCCCGGGAGAGCCA	
MPR1_rev&compl	GTGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA	
MPR2_rev&compl	TCCGTGCAGCCTCCAGGA	
HCV_MCR02_rev&compl		CCACTCCCCGGGAGAGCCA
#1		-----

09/530747

FIG 6

HCV	261	5'-GGTACTGCCTGATAGGGTCTTCGAGTCCCGGAGGTCCTCGTAGCCGTGCACCATGA-3'	333
Foreward primer CK10/Reverse primer CK20	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTCT-3'		3'-CAGAGMATMTGGMATCGTGTAMG-5'
Foreward primer CK11/Reverse primer CK20	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'		3'-CAGAGMATMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK10-1/Reverse primer CK20-1	5'-CGTACTGCCTTATAGGGTCT-3'		3'-CDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK11-1/Reverse primer CK20-1	5'-CGTACTGCCTTATAGGGTCT-3'		3'-CDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK10-2/Reverse primer CK20-2	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTMT-3'		3'-MDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Foreward primer CK11-2/Reverse primer CK20-2	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTMT-3'		3'-MDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Foreward primer CK10/Reverse primer CK21	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTCT-3'		3'-CTTCAGAGCATCTGGCATCGTGTACG-5'
Foreward primer CK10-1/Reverse primer CK21-1	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTCT-3'		3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK11-1/Reverse primer CK21-1	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTCT-3'		3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK10-1/Reverse primer CK21-2	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTCT-3'		3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK11-1/Reverse primer CK21-2	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTCT-3'		3'-CTPMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK10-2/Reverse primer CK21-3	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTMT-3'		3'-CTPMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Foreward primer CK11-2/Reverse primer CK21-3	5'-CGTAMTGMNTTATAGGGTMT-3'		3'-CTPMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
HGBV-B	389	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTCTTCGAGGGGATCTGGGAGTCTCGTAGCCGTAGCACATGC-3'	449

6/7

FIG 7

HCV		261 5' -GGTACTGCCTGATAGGGTCTGTGGAGTGGCCCGGAGGTCCTCGTAGACCGTGCACATGA-3' 333	
Forward primer CK12/Reverse primer CK22			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-2			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-3			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-4			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-5			
Forward primer CK12/Reverse primer CK23			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-2			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK23-3			
Forward primer CK12/Reverse primer CK24			
Forward primer CK12/Reverse primer CK24-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK24-2			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK24-3			
HGBV-B		389 5' -CGTACTGCCTGATAGGGTCTGTGGAGTGGCCCGGAGGTCCTCGTAGACCGTGCACATGC-3' 449	
Forward primer CK12/Reverse primer CK22			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-2			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-3			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-4			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-5			
Forward primer CK12/Reverse primer CK23			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-2			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK23-3			
Forward primer CK12/Reverse primer CK24			
Forward primer CK12/Reverse primer CK24-1			
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK24-2			
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK24-3			

FIG. 8

HCV 267 5' CCTTGTGTTACTGCCTGATAGGGTGCTTGGAGAGTGCCCCCGGAGGTCCTCGTAGACCGTGCCACCATGAGCACGAAT3' 341
|| | ||||||| ||||||| || || ||||||| ||||| |||||
HGBV-B 383 5' CCATACCGTACTGCCCTGATAGGGTCCTTGGAGGGGATCTGGGAGTCTCGTAGACCGTAGCACATGCCCTGTTATT3' 457

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/23250
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06961		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 22. Juli 1999 (22.07.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schloßbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Værløse (DK).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).			
(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS			
(54) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND SENSITIVES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid, comprising the following steps: the production of a number of enhancers of a fragment of said nucleic acid with a length of less than 100 nucleotides using two primers, one of said primers being able to bind to a first binding sequence (A) of a strand of the nucleic acid and the other primer being able to bind to a second binding sequence (C') which is essentially complementary to a sequence (C), said sequence (C) not overlapping with (A) and being positioned in the direction 3' from A, in the presence of a probe with a binding sequence (D) which is able to bind to the third sequence (B) positioned between the sequences (A) and (C) or the complement (B') thereof, said probe containing a reporter group and a quencher group, using a polymerase with 5' nuclease activity; and detection of the nucleic acid through the measurement of a signal which is determined by the release of the reporter group.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure enthaltend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit einer Länge von weniger als 100 Nukleotiden mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit (A) nicht überlappenden, in 3'-Richtung von (A) gelegenen Sequenz (C) im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz (D), welche an die zwischen den Sequenzen (A) und (C) gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/06961

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22 July 1987	1,2,4,5,9
Y	see example 2	3,6-8
Y	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18 June 1996 see column 8, line 22 - column 9, line 5; examples 1,3 see column 10, line 26 - column 11, line 30 see column 17, line 48 - column 18, line 61	3,6-8
A	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23 July 1996 see the whole document	1,5
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May 1999

Date of mailing of the international search report

02/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/06961

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 02690 A (ABBOTT LAB) 26 January 1995 see page 4; examples 9,10 ---	4
A	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25 July 1991 see page 4, line 8 - page 5, line 17 see page 8, line 14 - page 9, line 16 see page 12, line 13 - page 13, line 7 see page 14 - page 20, line 28 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0229701 A	22-07-1987	AT 127857 T	15-09-1995
		AU 606043 B	31-01-1991
		AU 6710987 A	16-07-1987
		CA 1279244 A	22-01-1991
		DE 3751513 D	19-10-1995
		DE 3751513 T	28-03-1996
		DK 10787 A	11-07-1987
		ES 2078214 T	16-12-1995
		IE 69565 B	02-10-1996
		JP 2576980 B	29-01-1997
		JP 62217161 A	24-09-1987
		JP 2574640 B	22-01-1997
		JP 6233700 A	23-08-1994
		US 5386022 A	31-01-1995
		US 5594123 A	14-01-1997
		US 5176995 A	05-01-1993
		US 5008182 A	16-04-1991
US 5527898 A	18-06-1996	US 5447839 A	05-09-1995
		US 5182377 A	26-01-1993
		US 5639871 A	17-06-1997
		US 5705627 A	06-01-1995
		AT 138108 T	15-06-1996
		AU 645483 B	20-01-1994
		AU 4401189 A	02-04-1990
		CA 1339262 A	12-08-1997
		DE 68926507 D	20-06-1996
		DE 68926507 T	16-01-1997
		EP 0433396 A	26-06-1991
		JP 2651483 B	10-09-1997
		JP 4500910 T	20-02-1992
		WO 9002821 A	22-03-1990
		US 5283171 A	01-02-1993
US 5538848 A	23-07-1996	AU 695561 B	13-08-1998
		AU 4283696 A	06-06-1996
		CA 2201756 A	23-05-1996
		EP 0792374 A	03-09-1997
		JP 10510982 T	27-10-1998
		WO 9615270 A	23-05-1996
		US 5876930 A	02-03-1999
		US 5723591 A	03-03-1998
WO 9502690 A	26-01-1995	AU 7326494 A	13-02-1995
		CA 2167056 A	26-01-1995
		EP 0785996 A	30-07-1997
		JP 9501829 T	25-02-1997
		US 5736334 A	07-04-1998
WO 9110675 A	25-07-1991	NL 9000134 A	16-08-1991
		AT 137809 T	15-05-1996
		AU 645286 B	13-01-1994
		AU 7071691 A	05-08-1991
		CA 2074069 A	20-07-1991
		DE 69119408 D	13-06-1996
		DE 69119408 T	05-12-1996
		DK 517704 T	09-09-1996
		EP 0517704 A	16-12-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 98/06961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9110675 A		ES 2088483 T	16-08-1996
		GR 3020302 T	30-09-1996
		US 5364758 A	15-11-1994
<hr/>			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06961

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987	1,2,4,5,9
Y	siehe Beispiel 2	3,6-8
Y	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 siehe Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5; Beispiele 1,3 siehe Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30 siehe Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61	3,6-8
A	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 siehe das ganze Dokument	1,5

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06961

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 02690 A (ABBOTT LAB) 26. Januar 1995 siehe Seite 4; Beispiele 9,10 ---	4
A	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991 siehe Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17 siehe Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16 siehe Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7 siehe Seite 14 - Seite 20, Zeile 28 -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06961

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0229701 A	22-07-1987	AT 127857 T	15-09-1995
		AU 606043 B	31-01-1991
		AU 6710987 A	16-07-1987
		CA 1279244 A	22-01-1991
		DE 3751513 D	19-10-1995
		DE 3751513 T	28-03-1996
		DK 10787 A	11-07-1987
		ES 2078214 T	16-12-1995
		IE 69565 B	02-10-1996
		JP 2576980 B	29-01-1997
		JP 62217161 A	24-09-1987
		JP 2574640 B	22-01-1997
		JP 6233700 A	23-08-1994
		US 5386022 A	31-01-1995
		US 5594123 A	14-01-1997
		US 5176995 A	05-01-1993
		US 5008182 A	16-04-1991
US 5527898 A	18-06-1996	US 5447839 A	05-09-1995
		US 5182377 A	26-01-1993
		US 5639871 A	17-06-1997
		US 5705627 A	06-01-1995
		AT 138108 T	15-06-1996
		AU 645483 B	20-01-1994
		AU 4401189 A	02-04-1990
		CA 1339262 A	12-08-1997
		DE 68926507 D	20-06-1996
		DE 68926507 T	16-01-1997
		EP 0433396 A	26-06-1991
		JP 2651483 B	10-09-1997
		JP 4500910 T	20-02-1992
		WO 9002821 A	22-03-1990
		US 5283171 A	01-02-1993
US 5538848 A	23-07-1996	AU 695561 B	13-08-1998
		AU 4283696 A	06-06-1996
		CA 2201756 A	23-05-1996
		EP 0792374 A	03-09-1997
		JP 10510982 T	27-10-1998
		WO 9615270 A	23-05-1996
		US 5876930 A	02-03-1999
		US 5723591 A	03-03-1998
WO 9502690 A	26-01-1995	AU 7326494 A	13-02-1995
		CA 2167056 A	26-01-1995
		EP 0785996 A	30-07-1997
		JP 9501829 T	25-02-1997
		US 5736334 A	07-04-1998
WO 9110675 A	25-07-1991	NL 9000134 A	16-08-1991
		AT 137809 T	15-05-1996
		AU 645286 B	13-01-1994
		AU 7071691 A	05-08-1991
		CA 2074069 A	20-07-1991
		DE 69119408 D	13-06-1996
		DE 69119408 T	05-12-1996
		DK 517704 T	09-09-1996
		EP 0517704 A	16-12-1992

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06961

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9110675 A		ES 2088483 T	16-08-1996
		GR 3020302 T	30-09-1996
		US 5364758 A	15-11-1994
<hr/>			

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/0B/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/06961	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/11/1997
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06961

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987	1,2,4,5,9
Y	siehe Beispiel 2	3,6-8
Y	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 siehe Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5; Beispiele 1,3 siehe Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30 siehe Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61	3,6-8
A	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 siehe das ganze Dokument	1,5

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Mai 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ nationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06961

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 02690 A (ABBOTT LAB) 26. Januar 1995 siehe Seite 4; Beispiele 9,10 ---	4
A	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991 siehe Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17 siehe Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16 siehe Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7 siehe Seite 14 - Seite 20, Zeile 28 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0229701 A	22-07-1987	AT 127857 T AU 606043 B AU 6710987 A CA 1279244 A DE 3751513 D DE 3751513 T DK 10787 A ES 2078214 T IE 69565 B JP 2576980 B JP 62217161 A JP 2574640 B JP 6233700 A US 5386022 A US 5594123 A US 5176995 A US 5008182 A	15-09-1995 31-01-1991 16-07-1987 22-01-1991 19-10-1995 28-03-1996 11-07-1987 16-12-1995 02-10-1996 29-01-1997 24-09-1987 22-01-1997 23-08-1994 31-01-1995 14-01-1997 05-01-1993 16-04-1991
US 5527898 A	18-06-1996	US 5447839 A US 5182377 A US 5639871 A US 5705627 A AT 138108 T AU 645483 B AU 4401189 A CA 1339262 A DE 68926507 D DE 68926507 T EP 0433396 A JP 2651483 B JP 4500910 T WO 9002821 A US 5283171 A	05-09-1995 26-01-1993 17-06-1997 06-01-1995 15-06-1996 20-01-1994 02-04-1990 12-08-1997 20-06-1996 16-01-1997 26-06-1991 10-09-1997 20-02-1992 22-03-1990 01-02-1993
US 5538848 A	23-07-1996	AU 695561 B AU 4283696 A CA 2201756 A EP 0792374 A JP 10510982 T WO 9615270 A US 5876930 A US 5723591 A	13-08-1998 06-06-1996 23-05-1996 03-09-1997 27-10-1998 23-05-1996 02-03-1999 03-03-1998
WO 9502690 A	26-01-1995	AU 7326494 A CA 2167056 A EP 0785996 A JP 9501829 T US 5736334 A	13-02-1995 26-01-1995 30-07-1997 25-02-1997 07-04-1998
WO 9110675 A	25-07-1991	NL 9000134 A AT 137809 T AU 645286 B AU 7071691 A CA 2074069 A DE 69119408 D DE 69119408 T DK 517704 T EP 0517704 A	16-08-1991 15-05-1996 13-01-1994 05-08-1991 20-07-1991 13-06-1996 05-12-1996 09-09-1996 16-12-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9110675 A		ES 2088483 T	16-08-1996
		GR 3020302 T	30-09-1996
		US 5364758 A	15-11-1994
